

コルチコイドおよび副腎アンドロゲン生合成に 関与する副腎皮質のチトクローム P-450-モノオキシゲ ナーゼ

著者	中陳 静男
雑誌名	星薬科大学紀要
号	25
ページ	1-12
発行年	1983
URL	http://id.nii.ac.jp/1240/00000048/

コルチコイドおよび副腎アンドロゲン生合成に関与する副腎皮質の チトクローム P-450-モノオキシゲナーゼ

中 陳 静 男

星薬科大学 生化学教室

Adrenocortical Cytochrome P-450-Monooxygenase Participating Biosynthesis of Corticoids and Adrenal Androgens

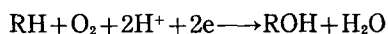
Shizuo NAKAJIN

Department of Biochemistry, Hoshi College of Pharmacy

はじめに

ステロイドホルモンの生合成はコレステロールを出発原料として、内分泌器管である副腎、精巣、卵巣および胎盤で生合成され、分泌されている。各々の内分泌器管では機能分化によりもたらされた特定の細細胞より、化学構造上ならびに生理機能の面からみて非常に特異性の高いステロイドホルモンを生合成し、分泌している。すなわち副腎皮質ホルモン (corticoids)、男性ホルモン (androgens)、卵胞ホルモン (estrogens) および黄体ホルモン (gestagens) 等を生合成し、分泌していることになる。

これらのステロイドホルモン生合成の過程は各種酵素の配列と基質特異性により進行していくが、その酵素の中には多数のチトクローム P-450 の関与するモノオキシゲナーゼ¹⁾ (monooxygenase: 1 原子酸素添加酵素) が知られている。モノオキシゲナーゼによって触媒される反応は次の式によって示すことができる。



この反応では溶存酸素分子の 1 原子が基質(RH)に組み込まれて、基質は水酸化され (ROH)、残りの 1 原子が水となる反応である。さらにこの反応には 2 個の電子が必要であり、還元型ビリジヌクレオチドから電子伝達系を介して電子が供給されている。ステロイドホルモンの生合成とチトクローム P-450 水酸化酵素系についての概要は数多くの総説^{2,3,4,5)} や成書⁶⁾ があるので参考にしていただきたい。

副腎はヒトの場合 7 g にも満たない小さな臓器であるが左右合わせて 1 日 60 mg にもおよぶコルチゾールを分泌しているといわれている。コルチゾールなどのステロイドホルモンの生合成は副腎皮質(adrenal cortex)で行なわれているが、皮質は細胞配列と細胞形態の特徴から組織学的に外層より球状層 (zona glomerulosa)、束状層 (zona fasciculata) および網状層 (zona reticularis) の 3 層に別れている。副腎皮質からは主なステロイドホルモンとしてコルチゾール、コルチコステロン等の糖質コルチコイド (glucocorticoids)、および鉱質コルチコイド (mineralocorticoids) であるア

本研究の一部は昭和57年度星薬科大学大谷研究助成の対象となったものである (紀要委員会)

ルドステロンが多量に生合成され、分泌されている。一方副腎由来の男性ホルモン (adrenal androgens) であるデヒドロエピアンドロステロンも多量に生合成され、かつ分泌されているが、その存在はあまり知られていない。副腎皮質におけるこれらのステロイドホルモンの生合成には細胞特異性があり、それぞれ糖質コルチコイドは束状層、副腎アンドロゲンは網状層および鉱質コルチコイドは球状層の細胞によって産生されて

いると考えられている。しかし、ステロイドホルモン産生の細胞レベルでの調節についてはまだ未知の部分が多い。

著者は副腎皮質ミトコンドリアに存在し、コレステロールの側鎖切断に関与するチトクローム P-450 の酵素化学的研究にたずさわる機会を得⁷⁾、その後薬物の解毒ならびに代謝に関与している肝ミクロソームの P-450 に関連し、内在性の脂質、特にステロイドを基質とするミクロソームの P-

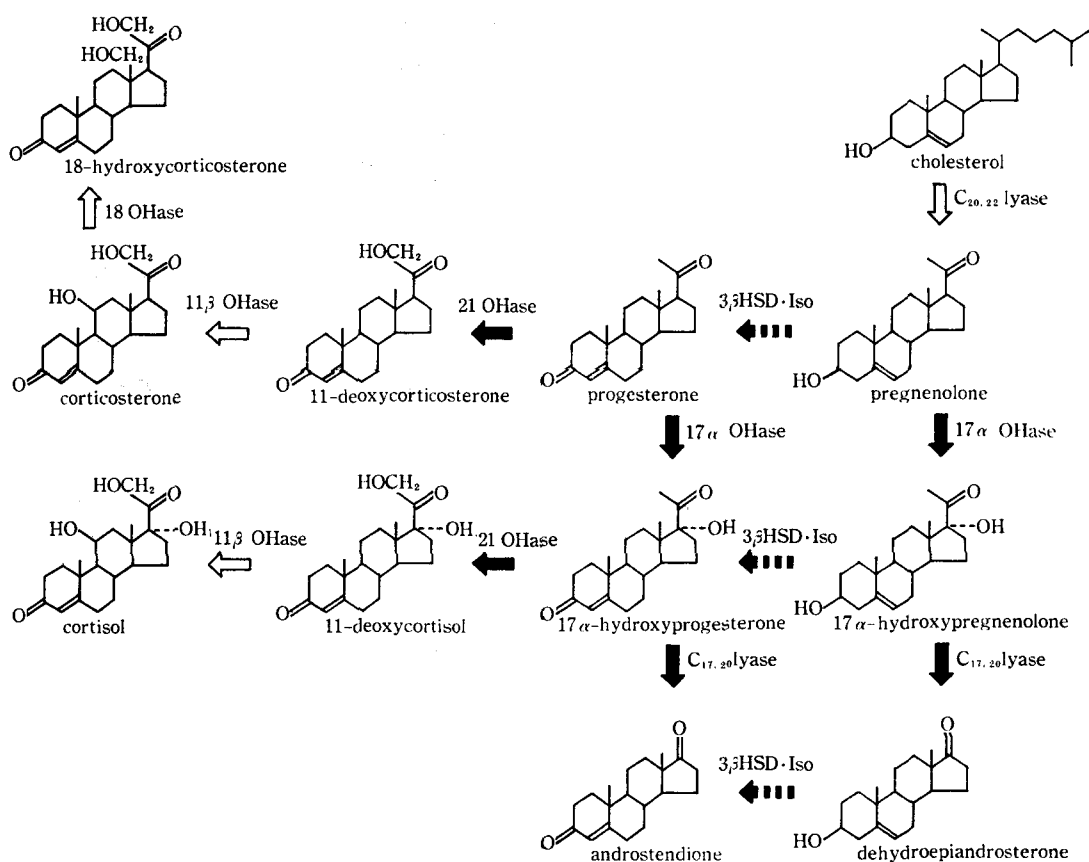


図1 コルチコイドおよびアドレナルアンドロゲン生合成に関与する酵素と生合成系路

$C_{20,22}$ lyase: C_{20} - C_{22} リアーゼ, $C_{17,20}$ lyase: C_{17} - C_{20} リアーゼ

3 β HSD: Δ^5 -3 β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ

Iso: Δ^5 - Δ^4 -3-オキシステロイドイソメラーゼ

OHase: ヒドロキシラーゼ

⇐ : ミトコンドリアに局在するチトクロームの P-450 関与する反応

→ : ミクロソームに局在するチトクローム P-450 の関与する反応

⋯ : ミクロソームに局在するがチトクローム P-450 の関与しない反応

450に興味を持ち、現在その酵素化学的研究の一端を行なっている。ここでは副腎皮質のコルチコイドとアンドロゲン生合成の調節に関与する酵素系、おもにチトクローム P-450モノオキシゲナーゼを取りあげ、主に著者らの研究結果を中心にその酵素化学的性質にふれ、両種のステロイドホルモンの生合成を酵素レベルで考察してみたい。

副腎におけるステロイド代謝

副腎皮質におけるステロイドの生合成はすべてのステロイドホルモンの内分泌器官がそうであるように、例外なくコレステロールを出発原料として生合成される(図1参照)。第1ステップとしてC_{20,22} リアーゼ (EC 1.14.1.9) の働きにより、炭素数27のコレステロールの側鎖が切断され、炭素数21のプレグネノロンが生合成される。この反応はミトコンドリアで行なわれるが、ミトコンドリア内膜に局在するフェレドキシン要求性のチトクローム P-450により触媒されており、ミクロソームに局在するチトクローム P-450とはピリジンスクレオチドからの電子伝達系が著しく異なる。ステロイド C_{20,22} リアーゼについては、その酵素化学的性質や反応メカニズムについての詳細な総説^{8,9)}があるので参考にしたい。

ミトコンドリアで生合成されたプレグネノロンは、次に小胞体に存在する3β-ヒドロキシステロ

イドデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.145) と 4^{4,5}-ケトステロイドイソメラーゼ (EC 5.3.3.1) あるいは17α-ヒドロキシラーゼ (EC 1.14.99.9) の働きによりプロゲステロンと17α-ヒドロキシプレグネノロンになると考えられる(図1参照)。

3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼは酸化型ピリジンスクレオチドであるNAD⁺を補酵素とし、4^{4,5}-ケトステロイドイソメラーゼと共役している。ミクロソームに局在するがチトクローム P-450 の関与はない。表Iに示したように、この酵素はC₂₁ステロイドであるプレグネノロン、17α-ヒドロキシプレグネノロンのみならずC₁₉ステロイドであるデヒドロエピアンドロステロンも基質とすることが出来、それぞれ対応する3ケト-4⁴-ステロイドを生成する¹⁰⁾。

放射能標識ステロイドである[4-¹⁴C]-プロゲステロンをNADPH再生系の存在下に副腎ミクロソームとインキュベーションを行なうと種々の代謝物が得られ、経時変化を追うことにより、代謝経路とそれに関与するNADPH要求性の酵素を明らかにすることができる。結果は図2に示すように、プロゲステロンの急激な減少にとともに、最初に17α-ヒドロキシプロゲステロンが生成され、次に21位に水酸化されたプロゲステロンであるデオキシコルチコステロンが生成される。これらはやがて減少し、それにもなって17α位

表I 副腎皮質(モルモット)ミクロソームのステロイド代謝酵素活性

Steroid-metabolizing enzyme	Substrate	Enzyme activity (nmol/min/mg protein)			
		Male		Female	
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
3β-Hydroxysteroid dehydrogenase with isomerase	Pregnenolone	14.0	13.7	12.6	14.3
	17α-Hydroxypregnenolone	10.7	—	9.9	—
	Dehydroepiandrosterone	20.5	—	19.2	—
17α-Hydroxylase C _{17,20} Lyase	Progesterone	9.4	9.2	9.8	9.7
	17α-Hydroxyprogesterone	4.5	5.7	4.8	5.2
21-Hydroxylase	Progesterone	5.8	5.5	6.6	5.3
	17α-Hydroxyprogesterone	7.0	7.5	9.0	6.7

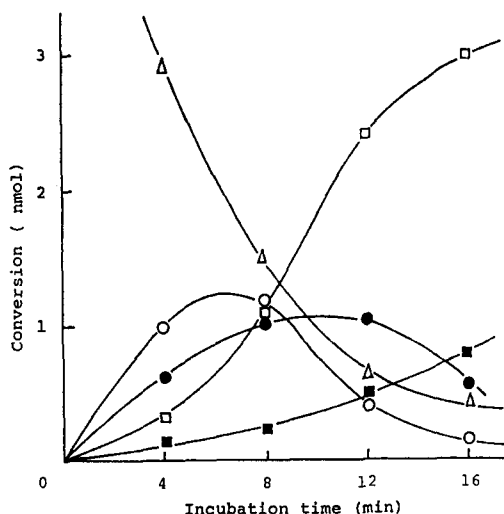


図2 副腎皮質(モルモット)ミクロソームによるプロゲステロンの代謝

[4-¹⁴C]-プロゲステロン (5 nmol) とミクロソーム (50 μg) を、グルコース-6-リン酸、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよび NADPH からなる NADPH 再生系の存在下、リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で、経時的にインキュベーションを行った。プロゲステロン (Δ), 17α-ヒドロキシプロゲステロン (○), 11-デオキシコルチコステロン (●), 11-デオキシコルチゾール (□), アンドロステンジオン (■)。

と21位に水酸化されたデオキシコルチゾールおよ

び側鎖切断をうけた C₁₉ ステロイドであるアンドロステンジオンが生成される。これらの結果はモリモット 副腎を用いて明らかにされ¹⁰⁾, 17α-ヒドロキシラーゼ, 21-ヒドロキシラーゼ (EC 1.14.99.10) および C_{17, 20} リアーゼの存在が示唆された。これらの酵素活性は一酸化炭素によって阻害されること¹¹⁾, さらに NADPH 要求性であることからチトクローム P-450関与の複合酵素系であることが明らかである。表 I にモルモット副腎ミクロソームの 17α-ヒドロキシラーゼ, C_{17, 20} リアーゼおよび 21-ヒドロキシラーゼ活性と基質特異性を示したが、これらの酵素活性に雌雄差は認められなかった¹⁰⁾。結論として、プロゲステロンは黄体ホルモンの本体でもあるが、副腎では分泌されることなく、生合成経路の中間体として得られ、同じく小胞体中存在する 21-ヒドロキシラーゼにより デオキシコルチコステロン、あるいは 17α-ヒドロキシラーゼの作用により 17α-ヒドロキシプロゲステロンとなる。17α-ヒドロキシプロゲネロンも 3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼと 4^{4,5}-ケトステロイドイソメラーゼにより 17α-ヒドロキシプロゲステロンとなり、21-ヒドロキシラーゼの働きにより デオキシコルチゾールに修飾されることになる。これら小胞体で修飾をうけたデオキシコルチコステロンおよび

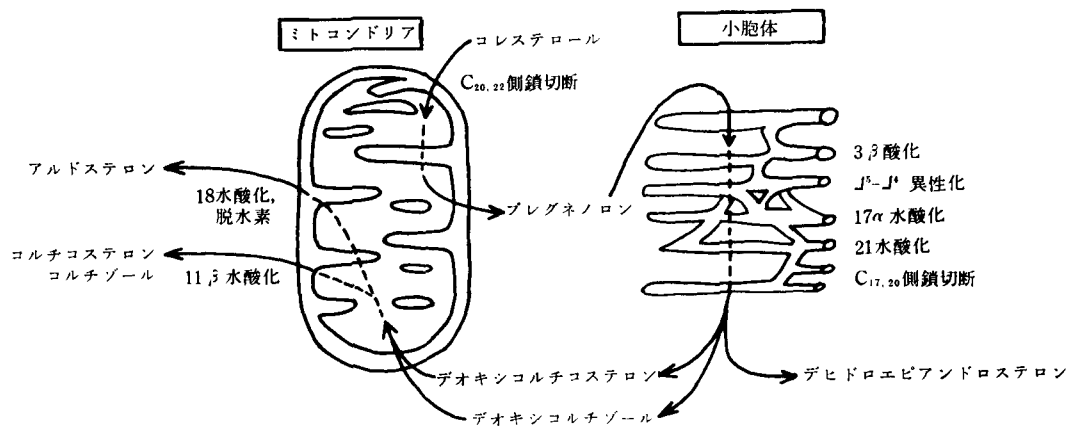


図3 副腎皮質におけるステロイドホルモン生合成

デオキシコルチゾールは、最終的には前述した $C_{20, 22}$ リアーゼと同様ミトコンドリアに局在する 11β -ヒドロキシラーゼ (EC 1.14.15.4) によってコルチコステロンおよびコルチゾールとして完成することになる (図1 参照)。さらにコルチコステロンの18位の水酸基導入からアルドステロン生成までの変換もミトコンドリアで行なわれる。このようにミトコンドリアを離れたステロイドは小胞体を経由して修飾をうけ、またミトコンドリアに戻ってくることになる (図3 参照)。

一方副腎には $C_{17, 20}$ リアーゼ活性も強く認められており、 17α -ヒドロキシプレグネロンの側鎖が切断されたデヒドロエピアンドロステロンがかなり多量に生成され、その大部分がサルフェートとなって血中に分泌されている。ヒトの場合、胎児期の副腎では 3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの活性は非常に低い、 17α -ヒドロキシラーゼおよび $C_{17, 20}$ リアーゼの活性は高く、胎児副腎での主な生成物の1つであると同時に、副腎アンドロゲンであるデヒドロエピアンドロステロンを多量に産生することになる。このデヒドロエピアンドロステロン産生の基質となるプレグネノロンは胎盤でつくられ、胎児副腎で側鎖切断をうけデヒドロエピアンドロステロンとなるが、さらに肝臓で 16α 位に水酸化をうけた後、再び胎盤でエストリオール生成の基質ともなる。このように胎児・胎盤系としても相互に密接な関連をしていると考えられる。 $C_{17, 20}$ リアーゼはまたコルチゾール等の側鎖も切断し、 11β -ヒドロキシ C_{19} ステロイドを産生する¹²⁾。これらも副腎アンドロゲンである。

以上述べてきたように副腎コルチコイド合成と副腎アンドロゲン合成には分岐点があり、その重要な酵素として 17α -ヒドロキシラーゼ、 $C_{17, 20}$ リアーゼ、 21 -ヒドロキシラーゼおよび 3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ ($4^{4, 5}$ -ケトステロイドイソメラーゼと共役) が小胞体に存在することになる。

17α -ヒドロキシラーゼ・ $C_{17, 20}$ リアーゼ

17α -ヒドロキシラーゼ・ $C_{17, 20}$ リアーゼはコルチゾールと副腎アンドロゲン合成の分岐点に存在する重要な酵素である。見かけ上 17α -ヒドロキシラーゼ活性と $C_{17, 20}$ リアーゼ活性として測定することが可能である。(表I 参照) いずれの反応もチトクローム P-450の関与するモノオキシゲナーゼ反応であり、長い間別な分子からなるチトクローム P-450が関与していると考えられていた。

17α -ヒドロキシラーゼ活性と $C_{17, 20}$ リアーゼ活性は精巣ミクロソームにも多量に存在しており、アンドロゲン合成に関与している。著者は以前に現 Worcester Foundation for Experimental Biology の Dr. Hall のもとに留学する機会を得、本酵素の精製、純化を手がけ、両酵素活性は同一分子のチトクローム P-450が触媒する反応であることを明らかにした^{13, 14, 15)}。精巣ではアンドロゲンが生成されるだけであり、 17α -ヒドロキシステロイドはこの反応中間体として考えられるが、副腎の場合には、 17α -ヒドロキシステロイドはコルチゾール合成の前駆体としても重要であり、コルチゾール合成に関与する 17α -ヒドロキシラーゼ、および副腎アンドロゲン合成に関与する $C_{17, 20}$ リアーゼというような2つの酵素を考えた方が、コルチコイドと副腎アンドロゲンの合成を合理的に説明することができる (図1 参照)。

帰国してから今度は副腎ミクロソームの 17α -ヒドロキシラーゼと $C_{17, 20}$ リアーゼについての酵素化学的研究に着手した。ブタ副腎ミクロソームを原料として、コール酸によりチトクローム P-450を可溶化した後、各種カラムクロストグラフィーにより精製を試みた。しかし精製の過程において同じミクロソームに局在するチトクローム P-450である 21 -ヒドロキシラーゼ活性は分離することができたが、 17α -ヒドロキシラーゼ活性と $C_{17, 20}$ リアーゼ活性の両活性は電気泳動的、タンパク化学的あるいは免疫化学的にも高度に純化されたに

もかわらず、最後まで分離することができず、最終的に 448 nm に CO 差スペクトルの極大吸収を示す分子量 45,000 のチトクローム P-450 として純化された¹⁶⁾。そこで同じくブタ精巣ミクロソームから純化した 17 α -ヒドロキシラーゼおよび C_{17,20} リアーゼの両活性を有するチトクローム P-450 との比較検討を行なった。精巣由来の本酵素の抗体を用いて免疫化学的な検討を行なうと、精巣由来と副腎由来の本酵素は共通な抗原決定部位を持つことが明らかとなった¹⁶⁾。さらに精巣由来の酵素に対する抗体で副腎由来の本酵素が有する 17 α -ヒドロキシラーゼ活性ならびに C_{17,20} リアーゼ活性は平衡して阻害されることも明らかにした¹⁷⁾。タンパク化学的にはわずかな分子量の違いと、アミノ酸組成においてわずかな相異が認められた¹⁷⁾。しかし N 末端アミノ酸配列は、両臓器由来のチトクローム P-450 について図 4 に示すように非常によく類似しており、それらの配列アミノ酸は多くの疎水性アミノ酸から成り立っていた¹⁷⁾。チトクローム P-450 が膜結合性であることを考慮すると、疎水性アミノ酸配列部位からなる

hydrophobic anchor が膜との結合部位である。そのため疎水性アミノ酸からなる配列部位は同じ配列をしている可能性も考えられ、それは疎水性アミノ酸からなる N 末端についても考えられることである。しかし図 4 に示すように同じミクロソームから精製純化した 21-ヒドロキシラーゼの N 末端配列とは大きな相違が認められた¹⁸⁾。また肝ミクロソームの多くのチトクローム P-450 で明らかにされている N 末端配列^{19,20)}を比較しても、疎水性アミノ酸から成っていることは類似していたが、本酵素と同じ配列は認められなかった。

一方、酵素化学的には副腎の本酵素が 3 ケー⁴-C₂₁ ステロイドである プロゲステロンのみではなく、3 β -ヒドロキシ⁴-C₂₁ ステロイドである プレグネノロンも基質とすることを明らかにし、精巣の酵素と基質特異性に関しても同じであることを認めた¹⁶⁾。表 II に両臓器由来の酵素のそれぞれの基質に対する両活性の最大反応速度 V_{max}、ミカエリス定数 K_m、それに基質と酵素の結合で認められるヘム鉄のスピン状態の変化を Soret 帯のスペクトル変化からとらえた結合常数 K_s を比較

図 4 副腎および精巣ミクロソームの 17 α -ヒドロキシラーゼ・C_{17,20} リアーゼと副腎ミクロソームの 21-ヒドロキシラーゼの N 末端アミノ酸配列の比較

17 α -Hydroxylase・C_{17,20} lyase (Adrenal): Met-Trp-Val-Leu-Leu-Val-Phe-Phe-Leu-Leu-Thr¹⁰-Leu-Thr-Tyr¹⁵-Leu-Phe-
 17 α -Hydroxylase・C_{17,20} lyase (testicular): Met-Trp-Val-Leu-Leu-Val-Phe-Phe-Leu-Leu-(Ser)-Leu-Thr-Tyr¹⁵-Leu-Phe-
 21-Hydroxylase (Adrenal): Met-Val-Leu-Val-Trp⁵-Leu-Leu-Leu-Leu-Thr¹⁰-Thr-Leu-Lys-Ala¹⁵-Gly-Ala-

表 II 副腎および精巣 17 α -ヒドロキシラーゼ・C_{17,20} リアーゼの酵素活性

Substrate	V _{max}				K _m (μM)		K _s (μM)	
	17α-Hydroxylase		C _{17,20} Lyase					
	Adrenal	Testicular	Adrenal	Testicular	Adrenal	Testicular	Adrenal	Testicular
Progesterone	6.9	4.6	—	—	1.8	1.5	1.0	0.9
17α-Hydroxyprogesterone	—	—	3.1	2.6	2.5	2.4	5.0	5.0
Pregnenolone	3.7	3.3	—	—	0.8	0.3	0.8	0.7
17α-Hydroxypregnenolone	—	—	2.0	2.1	0.9	0.3	0.8	0.7

した¹⁷⁾。両臓器の酵素は高い類似性を示した。著者らは両臓器の酵素は同じものであるが、わずかに臓器特異性が認められるのではないかと考えている。

次に同一分子のチトクローム P-450が見かけ上2つの酵素活性を示すのは、それぞれの酵素活性に対応する活性部位が存在するのだろうか。高度に純化されたチトクローム P-450を酵素として、P-450還元酵素との再構成によりprogesterone又はpregnenoloneを基質とする17 α -hydroxylase活性と、17 α -hydroxyl progesterone又は17 α -hydroxyl pregnenoloneを基質とするC_{17,20} lyase活性が測定可能である。C_{17,20} lyase活性は17 α -hydroxylase活性測定の基質であるprogesterone又はpregnenoloneにより強く阻害される²¹⁾。この現象はまずC₂₁ステロイドが17 α 位の水酸化を受け、そのまま酵素から離れることなくC₁₇-C₂₀間の切断が行なわれていることを示唆している。さらに17 α -hydroxylase活性もC_{17,20} lyaseの基質である17 α -hydroxyl progesteroneにより、弱いけれども競合的な阻害現象が認められ、両活性が1つの活性部位で触媒されている可能性を示唆した²¹⁾。その他、基質差スペクトルの飽和実験²¹⁾および平衡透析法による実験²¹⁾から、hydroxylaseとlyaseの活性部位は同一であろうという結論に達した。さらに本酵素反応によって生成される17 α -hydroxyl steroidはC₂₁ステロイドであるprogesteroneあるいはpregnenoloneからC₁₉ステロイドであるandrostenedioneあるいはdehydroepiandrosteroneに変換される時に、反応中間体として得られることを示唆した²²⁾。そして両活性のPhotochemical action spectrumから、本酵素の有する17 α 水酸化反応およびC₁₇-C₂₀間の側鎖切断の両反応にはプロトヘムの介在が必要であることも明らかにした²³⁾。

21-ヒドロキシラーゼ

副腎ミクロソームに局在しており、progesterone

表Ⅲ 副腎ミクロソーム(ブタ)の2種のチトクローム P-450, 17 α -hydroxylase・C_{17,20} lyase, 21-hydroxylaseの アミノ酸組成の比較

amino acid	No. of residues/molecule	
	17 α OHase・C _{17,20} Lyase	21 OHase
Asx	24	51
Thr	19	23
Ser	25	32
Glx	55	47
Pro	37	28
Gly	38	32
Ala	29	29
Val	21	24
Met	8	9
Ile	16	21
Leu	77	60
Tyr	8	8
Phe	16	30
Lys	16	28
His	17	14
Arg	32	30
Trp	1	4
Cys	4	5
total	454	475

ronおよび17 α -hydroxyl progesteroneを基質とし、21位に水酸基を導入する酵素であり、progesteroneおよび17 α -hydroxyl progesteroneがcolchicineへの第1歩を踏み出すわけである。分子状酸素とNADPHを補酵素とするステロイド代謝酵素がチトクローム P-450の関与していることを明らかにした最初の酵素でもあり²⁴⁾、歴史的な酵素でもある。

すでにウシ、ブタの副腎ミクロソームより可溶化され、450 nmにCO差スペクトルの極大吸収を有するチトクローム P-450として純化されており、その酵素化学的性質が明らかにされている^{18, 25, 26)}。さらに著者らによるブタ副腎の本酵素の1次構造解析も進行しており、表Ⅲに17 α -hydroxylase・C_{17,20} lyaseと比較してアミノ酸組成を示した。また図4に明らかになったN末端配

列の一部を示した。

純化した本酵素と P-450還元酵素による再構成において、 3β -ヒドロキシ- Δ^5 -ステロイドである プレグネノロンや 17α -ヒドロキシプレグネノロンは基質とならないが、 3 ケト- Δ^4 -ステロイドである プログステロン、 17α -ヒドロキシプロゲステロンは基質となり、プロゲステロンよりも 17α -ヒドロキシプロゲステロンを基質とした時に21位水酸化のターンオーバー数の高いことが観察される。また本酵素とプロゲステロンを競合的に基質とする 17α -ヒドロキシラーゼ・C_{17, 20} リアーゼのターンオーバー数を比較した場合も、21-ヒドロキシラーゼ活性のターンオーバー数は 17α -ヒドロキシラーゼ活性のそれと比較して8倍ほど高い値を示すことが観察される²⁷⁾。

3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、 $\Delta^{4,5}$ -ケトステロイドイソメラーゼ

3β -ヒドロキシ- Δ^5 -ステロイドを 3 ケト- Δ^5 -ステロイドに変換する酵素が 3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼであり、二重結合を B 環から A 環へ、すなわち Δ^5 から Δ^4 へ移行させるのが $\Delta^{4,5}$ ケトステロイドイソメラーゼであり、まったく作用型式の異なる酵素である (図5参照)。これらの酵素はチトクローム P-450 の関与は無いが、膜結合性の酵素であり、副腎のみならず精巣、卵巣等にも分布しており、高等動物の他にステロイドを炭素源として利用するバクテリアにも認められる。

3β -ヒドロキシ- Δ^5 -ステロイドを NAD^+ の存在下に副腎ミクロソームとインキュベーションを行なうと、反応生成物として直ちに 3 ケト- Δ^4 -ステロイドが得られ、デヒドロゲナーゼの作用によって生成されと考えられる 3 ケト- Δ^5 -

ステロイドは検出できない²⁸⁾。デヒドロゲナーゼとイソメラーゼが絶えず共役しているのである。副腎ミクロソームを酵素として使用すると、 3β -ヒドロキシ- Δ^5 -ステロイドから 3 ケト- Δ^4 -ステロイドを1モル生成する過程は1モルの NAD^+ を補酵素として利用するが、イソメラーゼの基質と考えられる 3 ケト- Δ^5 -ステロイドから 3 ケト- Δ^4 -ステロイドが生成する過程は補酵素を必要とせず、反応速度が速い²⁹⁾。従って副腎のデヒドロゲナーゼの反応には NAD^+ を補酵素として利用するが、イソメラーゼの反応は補酵素を必要としない反応ということになる。

事実、バクテリアでは testosterone から イソメラーゼが精製、純化されており、デヒドロゲナーゼとは別の分子であることが明らかにされている^{29, 30)}。さらに補酵素を必要としないことと、 Δ^5 から Δ^4 への位置異性化反応が分子内水素転位反応であるという反応メカニズムについても明らかにになっている^{31, 32)}。

一方、高等動物である哺乳類の副腎に関しても、本酵素の分離、精製についての報告があり、純化したにもかかわらず両活性が認められるという報告³³⁾やクロマト的に両活性を分離できたという報告もあり³⁴⁾、現在もお論議されているところである。

生合成場での複合酵素系の相互作用

コルチコイドと副腎アンドロゲン生合成に関与している 17α -ヒドロキシラーゼ・C_{17, 20} リアーゼ、21-ヒドロキシラーゼ、 3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼおよび $\Delta^{4,5}$ -ケトステロイドイソメラーゼ、それに後述する電子伝達に関与しているフラビン酵素である P-450還元酵素およびチトクローム b_5 はすべて小胞体に局在している

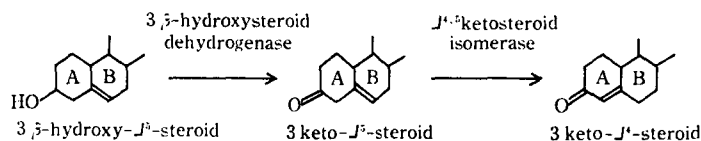


図5 3β -ヒドロキシ- Δ^5 -ステロイドから 3 ケト- Δ^4 -ステロイドへの転換

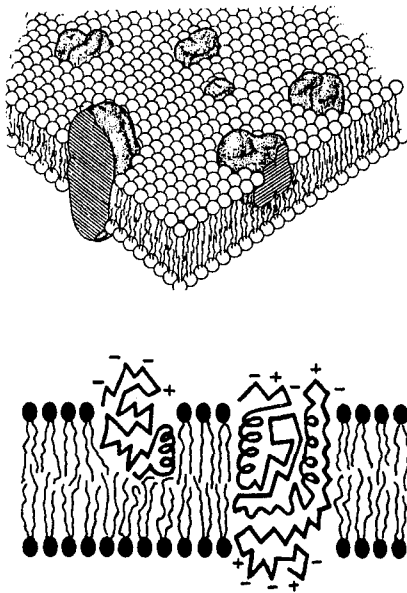


図6 タンパク質が生体膜に埋めこまれたモデル

上の図はリン脂質で構成された二重層膜の中に埋めこまれた球状タンパク質を立体的にえがいてあり、下の図はその断面を模式している。+、-はタンパク質を構成している極性アミノ酸を示している。(S. J. Singer, G. L. Nicolson, Science, 175, 720 (1952) から転載)

膜結合性の酵素である。膜との結合は図6に示した Singer-Nicolson のモデル⁸⁵⁾が理解しやすい。酵素タンパクの非極性アミノ酸配列からなる疎水性部分である hydrophobic anchor はリン脂質で構成された流動的な二重層膜の中に埋めこまれた形をしており、膜の内部に疎水結合によって保持されている。極性アミノ酸からなる親水性部分は膜表面から突出しており、水相に接していると考えられている。これは基質であるステロイドの疎水的な性質と補酵素の親水的な性質を考えた時、非常に合理的であるように思われる。

チトクローム P-450 の関与する 17 α -ヒドロキシラーゼ \cdot C_{17,20} リアーゼおよび 21-ヒドロキシラーゼはヘムタンパク質であるチトクローム P-450 を末端酵素とした複合酵素系であり、還元型ピリジヌクレオチド(主に NADPH)から P-450 還元酵素を介する電子伝達系が必要である。実際に

17 α -ヒドロキシラーゼ \cdot C_{17,20} リアーゼや 21-ヒドロキシラーゼは NADPH の存在下で、それぞれの酵素に対応するチトクローム P-450 と P-450 還元酵素により活性の再構成を行うことができる。著者らはブタ副腎ミクロソームを原料として P-450 還元酵素を純化し、その酵素化学的性質を検討している²⁷⁾。酵素活性の再構成において、チトクローム P-450 に P-450 還元酵素を加えると、チトクローム P-450 のモノオキシゲナーゼ活性は増加し、両者のモル比が 1:1 の時にモノオキシゲナーゼ活性は飽和する。この結果は NADPH からの電子伝達の際にチトクローム P-450 1 モルに P-450 還元酵素 1 モルが対応していることになる。しかしミクロソームに存在するチトクローム P-450 と P-450 還元酵素のモル比は 50:1 ほどである。小胞体上ではチトクローム P-450 に対して常に少ない量の P-450 還元酵素が存在することにより、複合酵素系のモノオキシゲナーゼ活性は P-450 還元酵素によって律速されていることが考えられる。副腎小胞体に存在するモノオキシゲナーゼはその酵素の特異性を決定しているチトクローム P-450 が 17 α -ヒドロキシラーゼ \cdot C_{17,20} リアーゼと 21-ヒドロキシラーゼの 2 種類存在するが、P-450 還元酵素は一種類で、両チトクローム P-450 に電子伝達を行なっているわけである。

さらに興味ある事実として、ブタ副腎ミクロソームから P-450 還元酵素の精製過程で、チトクローム c を電子受容体として精製を行なうと 2 種類の還元酵素が得られるのである。純化された両還元酵素間には約 6,000 の分子量の違いが認められるが、チトクローム c やその他の電子受容体への電子伝達は同じように行なうのである。しかしチトクローム P-450 を電子受容体として測定した 17 α -ヒドロキシラーゼ、C_{17,20} リアーゼおよび 21-ヒドロキシラーゼ活性は分子量の大きい還元酵素により再構成できるが、分子量の小さい還元酵素では再構成することができなかった⁸⁶⁾。これらの結果は肝ミクロソームの報告^{87, 88)}と考え合わせると、P-450 還元酵素の精製過程でライソゾ

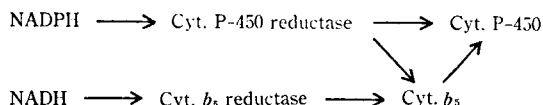


図7 副腎ミクロソームのP-450モノオキシゲナーゼ反応の電子伝達系路

ーナル酵素により、膜との結合に関与している hydrophobic anchor の切断が起こり、チトクローム *c* やその他の電子受容体には電子伝達を行なうが、チトクローム P-450には電子伝達を行なわないと考えられる。P-450還元酵素の NADPH との電子伝達は膜表面に突出した親水性部分で行なわれていることは補酵素の親水的な性質からも明らかであるが、hydrophobic anchor の存在しない分子量の小さい還元酵素がチトクローム P-450の触媒するモノオキシゲナーゼ活性を再構成できないということは、チトクローム P-450とP-450還元酵素の結合部位が hydrophobic anchor の部分にあり、小胞体の膜面下で両者間の電子伝達が行なわれていることを示唆している。

一方、副腎ミクロソームは同じ膜結合性のヘムタンパク質であるチトクローム *b*₅ も NADH 依存性の *b*₅還元酵素とともに存在しており、副腎小胞体の P-450モノオキシゲナーゼ反応に図7に示すようなチトクローム *b*₅ の電子伝達系の関与が示唆されている。チトクローム P-450モノオキシゲナーゼの反応サイクルが1回転するために、言い換えると、モノオキシゲナーゼ反応が1回ターンオーバーするために2個の電子の流入が必要であり³⁹⁾、1回目の電子はP-450還元酵素を経由して流入し、2個目の電子が *b*₅ を経由して流入するという考え方が一般的である⁴⁰⁾。

17 α -ヒドロキシラーゼ・C_{17,20} リアーゼに関するチトクローム P-450モノオキシゲナーゼとチトクローム *b*₅ との相互作用は精巣の酵素について詳細に検討されており、ピリジヌクレオチドからチトクローム *b*₅ への電子伝達は図7に示したように NADH から *b*₅還元酵素を経由してくる流れと、NADPH からチトクローム P-450を経由する流れが明らかにされており、後者の流れの方が

有意であるらしい^{41,42,43)}。あらためてその電子伝達の複雑さには驚かされるが、またその不確実性に関してはとまどいも感じる。

さらに最近になって明らかにされたことは、チトクローム P-450とP-450還元酵素から成る再構成系にチトクローム *b*₅ を添加することにより、C_{17,20} リアーゼ活性は17 α -ヒドロキシラーゼ活性よりも強い増加を示すことである^{42,44)}。両酵素活性を示すが1種類のチトクローム P-450の触媒する反応でありながら、チトクローム *b*₅ の両活性への、すなわち17 α -ヒドロキシラーゼ活性とC_{17,20} リアーゼ活性への関与が異なるのである。この現象は精巣ミクロソームから17 α -ヒドロキシラーゼ・C_{17,20} リアーゼの精製の過程で、チトクローム *b*₅ が除かれると、リアーゼ活性が極端に低下する¹⁴⁾ということからも示唆されていた。

17 α -ヒドロキシラーゼ・C_{17,20} リアーゼの反応メカニズムを考える時、前述したように本酵素の活性部位が1ヶ所であり、両活性すなわち17 α -ヒドロキシラーゼ活性およびC_{17,20} リアーゼ活性にプロトヘムの介在が必要であるとすると、ミトコンドリアのC_{20,22} リアーゼに関して報告されているような反応メカニズムをあてはめて考えることができる。C_{20,22} リアーゼの場合はチトクローム P-450が基質であるコレステロールを活性部位にかかえこんだままで、分子状酵素を利用したC₂₀位とC₂₂位の水酸化とC₂₀-C₂₂の切断を行なうというのである⁹⁾。すなわち数回の酸素添加による水酸化反応を行なった後に脱アルキル化されることになる。

17 α -ヒドロキシラーゼ・C_{17,20} リアーゼの場合はC₂₁ステロイドの17 α 位が水酸化された、反応生成物が酵素の活性部位を離れることなく続いてC₁₇-C₂₀の切断反応が起こるという考え方である。その時位給される電子が、17 α 位の水酸化の時には2個ともP-450還元酵素からチトクローム P-450に流入し、続いて行なわれるC₁₇-C₂₀の切断反応には1個目の電子はP-450還元酵素から流入するが、2個目の電子はチトクローム *b*₅ を経由

してチトクローム P-450へ流入することが考えられる。はたしてこのような仮説が成り立つであろうか。もし成り立つとすると、副腎小胞体ではチトクローム P-450 の1回目のターンオーバーで水酸化された反応中間体であろうと考えられる17 α -ヒドロキシ C₂₁ステロイドが、同じ小胞体に埋めこまれている21-ヒドロキシラーゼ活性を触媒する別の分子であるチトクローム P-450にもぎとられ、コルチゾールに変換されてゆくことになる。はたしてありえるだろうか。その回答は今後さらにこの分野で蓄積されるであろう研究成果を待たねばならない。

おわりに

ステロイドホルモンの生合成はチトクローム P-450 関与のモノオキシゲナーゼ反応を考慮しなくては論じられない程、チトクローム P-450 の存在は不河決である。薬学の分野では薬物の代謝に関連して、肝ミクロソームのチトクローム P-450

に関心が高く、その分野に関する研究が優先されそうに思えるが、チトクローム P-450 本来の生理的な機能や特性を知る上で、生体のホメオスタシスに重要な働きをしているステロイドホルモンの特に生合成に関与するチトクロームの酵素化学的研究は不河決であり、かつ重要な位置を占めるものとする。

謝辞 副腎ミクロソームの P-450 モノオキシゲナーゼの酵素化学的研究を進めるにあたり、本学大谷 研究助成金および昭和 57 年度文部省科学研究費 補助金を使わせていただいたことに感謝申し上げる。また本稿でとり上げた研究の一部は Worcester Foundation for Experimental Biology の P.F. Hall 博士、City of Hope Research Institute の J.E. Shively 博士との協同研究の成果であり、両博士に御指導いただいたことを付記する。

さらに研究の場を与えて下さり、本稿を御校閲下さった、本学生化学教室、篠田雅人教授に感謝申し上げます。

文 献

- 1) O. Hayaishi and M. Nozaki, *Science*, **164**, 389 (1965).
- 2) 色田幹雄, 稲野宏志, 玉置文一, 代謝, **13**, 983(1976).
- 3) 三谷美美子, 代謝, **13**, 1675(1976).
- 4) 市川佳幸, 医学のあゆみ, **115**, 510(1980).
- 5) 中陳静男, 小船新一, 篠田雅人, 星薬科大学紀要, **22**, 17(1980).
- 6) 色田幹雄, "ステロイドホルモンの生物化学" 日本比較内分泌学会編, 学会出版センター, 東京, 1978, pp.17-47.
- 7) S. Nakajin, Y. Ishii, M. Shinoda and M. Shikita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 524 (1979).
- 8) 色田幹雄, 蛋白質, 核酸, 酵素, **20**, 516(1975).
- 9) 色田幹雄, 生化学, **49**, 76(1977).
- 10) S. Nakajin and M. Shinoda, *J. Pharm. Dyn.*, **6**, 859 (1983).
- 11) 中陳静男, 小船新一, 篠田雅人, 薬学雑誌, **103**, 895(1983).
- 12) 藤村義幸, 須原克子, 片桐正之, 第56回日本生化学大会, 福岡, 1983年9月.
- 13) S. Nakajin and P. F. Hall, *Fed. Proc.*, **39**, 1723 (1980).
- 14) S. Nakajin and P. F. Hall, *J. Biol. Chem.*, **256**, 3871 (1981).
- 15) S. Nakajin, J. E. Shively, P. M. Yuan and P. F. Hall, *Biochemistry*, **20**, 4037 (1981).
- 16) S. Nakajin, M. Shinoda and P. F. Hall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**, 512 (1983).
- 17) S. Nakajin, M. Shinoda, M. Haniu, J. E. Shively and P. F. Hall, *J. Biol. Chem.*, "in press".
- 18) P. M. Yuan, S. Nakajin, M. Haniu, M. Shinoda, P. F. Hall and J. E. Shively, *Biochemistry*, **22**, 143 (1983).
- 19) L. H. Bolelho, D. E. Ryan and W. Levin, *J. Biol. Chem.*, **254**, 5635 (1979).
- 20) D. A. Haugen, L. G. Armes, K. T. Yasinobu and M. J. Coon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 967 (1977).
- 21) S. Nakajin, P. F. Hall and M. Onoda, *J. Biol. Chem.*, **256**, 6134 (1981).

- 22) S. Nakajin and P. F. Hall, *J. Steroid Biochem.*, **14**, 1249 (1981).
- 23) S. Nakajin and P. F. Hall, *J. Steroid Biochem.*, **19**, 1345 (1983).
- 24) T. Omura, R. Sato, D. Y. Cooper, O. Rosenthal and R. W. Estabrook, *Fed. Proc.*, **24**, 1181 (1965).
- 25) S. Kominami, H. Ochi, Y. Kobayashi and S. Takemori, *J. Biol. Chem.*, **255**, 3386 (1980).
- 26) A. Hiwatashi and Y. Ichikawa, *Biochim. Biophys. Acta*, **664**, 33 (1981).
- 27) 中陳静男, 小船新一, 篠田雅人, 薬学雑誌, **104**, 169 (1984).
- 28) 中陳静男, 篠田雅人, 「投稿準備中」
- 29) A. M. Benson, P. Jaraback, P. Talalay, *J. Biol. Chem.*, **246**, 7514 (1971).
- 30) R. Jarabak, M. Colvin, S. H. Moolgaukar and P. Talalay, "Methods in Enzymology Vol. XV" ed., R. B. Clayton, Academic Press, New York, 1969, pp. 642-651.
- 31) P. Talalay and V. S. Wang, *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 300 (1955).
- 32) S. K. Malhotra and H. J. Ringold, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3228 (1965).
- 33) H. C. Ford and L. L. Engel, *J. Biol. Chem.*, **249**, 1363 (1974).
- 34) J. Gallay, M. Vincent, C. Depaillerets and A. Alfsen, *Biochim. Biophys. Acta*, **529**, 79 (1978).
- 35) S. J. Singer and G. L. Nicolson, *Science*, **175**, 720 (1952).
- 36) 中陳静男, 小船新一, 篠田雅人, 日本薬学会第104年会, 仙台, 1974年3月.
- 37) S. D. Black, J. S. French, C. H. William, Jr., and M. J. Coon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 1528 (1979).
- 38) J. R. Gum and H. W. Strobel, *J. Biol. Chem.*, **256**, 7478 (1981).
- 39) M. J. Coon, T. A. Hoeven, R. W. Kaschnilz and H. W. Strobel, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **212**, 449 (1973).
- 40) M. A. Correia and G. J. Mannering, *Mol. Pharmacol.*, **9**, 455 (1973).
- 41) H. Ohba, H. Inano and B. Tamaoki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 1273 (1981).
- 42) M. Onoda and P. F. Hall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 454 (1982).
- 43) M. Katagiri, K. Suhara, M. Shiroo and Y. Fujimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 379 (1982).
- 44) 新沢恭子, 小南思郎, 武森重樹, 第56回日本生化学大会, 福岡, 1983年9月.